

DOCUMENT D  
PRIORITÉ  
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA REGLE  
17.1.a) OU b)

Q U E F R A N C A I

PCT/FR99/03270

**INPI**  
INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

REC'D 14 JAN 2000	
WIPO	PCT

# BREVET D'INVENTION

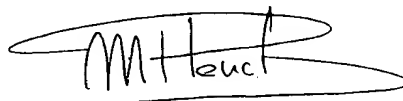
CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 06 JAN. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets



Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **24 Dec 98**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **98 16462-**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**  
DATE DE DÉPÔT **24 DEC. 1998**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**CABINET ORES**  
**6, avenue de Messine**  
**75008 PARIS**  
**FRANCE**

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone  
**MJPcb539/89FR**

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire  
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen  
demande initiale  
☐ brevet d'invention

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**BACTERIES A GRAM POSITIF DEPOURVUES D'ACTIVITE PROTEASIQUE HTRA,  
ET LEURS UTILISATIONS**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA**

Forme juridique

**Etablissement public**

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

**47, rue de l'Université**  
**75338 PARIS CEDEX 07**

Pays

**FRANCE**

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs ☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES ☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

**VIALLE-PRESLES Marie-José (n° 93-2009)**

DÉPARTEMENT DES BREVETS


26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2.  
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>V s références pour ce dossier</b> (facultatif)		MJPCb539/89FR	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		98 16462	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)			
BACTERIES A GRAM POSITIF DEPOURVUES D'ACTIVITE PROTEASIQUE HtrA, ET LEURS UTILISATIONS			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>			
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) 147, rue de l'Université 75338 PARIS CEDEX 07 FRANCE			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
<b>Nom</b>		POQUET	
<b>Prénoms</b>		Isabelle	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	56-62, rue de Vouillé	
	<b>Code postal et ville</b>	75015	PARIS
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)			
<b>Nom</b>		GRUSS	
<b>Prénoms</b>		Alexandra	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	25, rue Louis Scocard	
	<b>Code postal et ville</b>	91400	ORSAY
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)			
<b>Nom</b>		BOLOTINE	
<b>Prénoms</b>		Alexandre	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	5, rue Maréchal Gallieni	
	<b>Code postal et ville</b>	54000	NANCY
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (N m et qualité du signataire)		Paris, le 27 décembre 1999    VIALLE-PRESLES Marie-José (n° 93-2009)	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

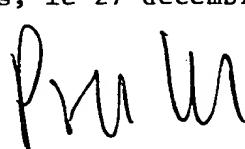
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		MJPcb539/89FR	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		98 16462	
<b>TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>			
BACTERIES A GRAM POSITIF DEPOURVUES D'ACTIVITE PROTEASIQUE HtrA, ET LEURS UTILISATIONS			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>			
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) 147, rue de l'Université 75338 PARIS CEDEX 07 FRANCE			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).</b>			
<b>Nom</b>		SOROKINE	
<b>Prénoms</b>		Alexei	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	8, res. les Quinconces	
	<b>Code postal et ville</b>	91190	GIF-SUR-YVETTE
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>			
<b>Prénoms</b>			
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>		
	<b>Code postal et ville</b>		
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>			
<b>Prénoms</b>			
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>		
	<b>Code postal et ville</b>		
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <del>DU DES DEMANDEUR(S)</del> <del>DU MANDATAIRE</del> (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 27 décembre 1999    VIALLE-PRESLES Marie-José (n° 93-2009)	

BACTÉRIES À GRAM POSITIF DÉPOURVUES D'ACTIVITÉ  
PROTÉASIQUE HtrA, ET LEURS UTILISATIONS.

L'invention concerne la production, chez des bactéries à Gram-positif, de protéines exportées.

5 On désigne sous le terme général de :  
« protéines exportées », des protéines qui sont transportées à travers la membrane cytoplasmique. Dans le cas des bactéries à Gram-positif, ce transport aboutit à la sécrétion de la protéine dans le milieu, ou à son  
10 association à la surface cellulaire.

L'un des principaux problèmes qui se pose lors de la production de protéines d'intérêt exportées par des bactéries-hôtes, réside dans la dégradation de ces protéines pendant et/ou après leur exportation, au niveau  
15 de l'enveloppe ou de la surface de la cellule. Cette dégradation entraîne souvent une baisse du rendement, et/ou une altération de la structure et de l'activité de la protéine.

Les enzymes responsables de cette dégradation  
20 des protéines exportées, sont des protéases bactériennes elles-mêmes exportées dans l'enveloppe ; il s'agit de protéases dites : « de ménage », qui ont normalement parmi leurs fonctions principales un rôle de dégradation de protéines exportées anormales ou mal repliées  
25 s'accumulant dans le milieu ou dans l'enveloppe, notamment en conditions de stress, ainsi qu'un rôle de recyclage des protéines exportées.

Les protéines hétérologues, qui sont souvent imparfaitement reconnues par les protéines chaperons  
30 intervenant dans le repliement des protéines chez la bactérie-hôte sont particulièrement sensibles à l'attaque de ces protéases.

La protéase de ménage exportée la plus anciennement caractérisée est la protéase à sérine  
35 HtrA/DegP d'*E. coli*. Il s'agit d'une protéase à localisation périplasmique, qui est exprimée sous

contrôle d'un promoteur inductible à haute température ;  
 BECKWITH et STRAUCH (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:1576-  
 1580, 1988) ont observé qu'elle intervenait dans la  
 5 protéolyse de protéines de fusion entre des protéines  
 exportées d'*E. coli* et le rapporteur de l'exportation  
 PhoA. Ils ont proposé d'inactiver cette protéase chez *E.*  
*coli* afin de limiter la dégradation des protéines  
 hétérologues exportées.

Des souches mutantes d'*E. coli*, dans  
 10 lesquelles le gène codant pour la protéase HtrA/DegP a  
 été inactivé ont ainsi été obtenues [BECKWITH et STRAUCH,  
 publication précitée, et Demande PCT WO88/05821] ;  
 cependant il a été constaté que cette inactivation se  
 traduit par un ralentissement de la cinétique de  
 15 dégradation, mais ne suffit pas pour l'abolir, du fait de  
 l'existence dans l'enveloppe d'autres protéases dégradant  
 les protéines exportées.

Chez *E. coli*, plusieurs protéases de ménage de  
 l'enveloppe, assurant des fonctions similaires à celles  
 20 de HtrA/DegP ont été caractérisées : il s'agit notamment  
 des protéases HhoA/DegQ et HhoB/DegS, structurellement  
 homologues à HtrA/DegP, et de protéases de structure  
 différente mais fonctionnellement comparables  
 (ApeA/protéaseI, OmpT, OmpP, Prc/Tsp, SppA/protéaseIV,  
 25 PrtIII et SohB).

Des études concernant d'autres bactéries ont  
 également permis de mettre en évidence l'existence dans  
 chaque espèce étudiée, de plusieurs protéases de ménage  
 exportées. Par exemple, de très nombreuses espèces  
 30 bactériennes possèdent plusieurs protéases de la famille  
 HtrA (PALLEN et WREN, Mol. Microbiol. 19:209-21, 1997) ;  
 trois homologues de HtrA ont été identifiés chez *B.*  
*subtilis* (YyxA, YkdA et YvtB/Yirf), *Synechocystis* (HtrA,  
 HhoA et HhoB), *Pseudomonas aeruginosa* et *Aquifex*  
 35 *aeolicus*, deux chez *Haemophilus influenzae* (HtoA et  
 HhoB), *Campylobacter jejuni*, *Brucella abortus* et *Yersinia*

enterolitica, et quatre chez *Mycobacterium tuberculosis*. Diverses bactéries à Gram-positif possèdent également des protéases à sérine considérées comme apparentées à la famille HtrA, sur la base d'une homologie au niveau du  
 5 domaine catalytique : EtA, EtB, V8/StsP de *S. aureus*, GseP de *Bacillus licheniformis* et Spro de *Mycobacterium paratuberculosis* (KOONIN et al., Chap 117 in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, 2203-17, 1997). Enfin, des protéases exportées non-apparentées à HtrA, ont  
 10 également été mises en évidence, par exemple chez *B. subtilis* (MARGOT et KARAMATA, Microbiology, 142:3437-44, 1996 ; STEPHENSON et HARWOOD Appl. Environn. Microbiol. 64:2875-2881, 1998 ; WU et al. J. Bacteriol. 173:4952-58, 1991).

15 Il a donc été proposé de combiner des mutations affectant plusieurs protéases exportées, pour parvenir à une réduction effective de la dégradation des protéines hétérologues exportées.

Par exemple, une souche d'*E. coli* mutée dans  
 20 les gènes *degP/htrA*, *ompT*, *prt* et *prc* (MEERMAN et GEORGIOU, Bio/technology 12:1107-10, 1994), et une souche de *B. subtilis* déficiente dans les six protéases extracellulaires (WU et al., 1991, publication précitée), ont été construites dans ce but. Cependant, l'utilisation  
 25 de ces souches ne permet pas d'éliminer totalement la protéolyse des protéines exportées. Par exemple, dans le cas de la souche de *B. subtilis* décrite par WU et al., bien que l'activité protéasique extracellulaire résiduelle soit négligeable (<1%), la dégradation des  
 30 protéines hétérologues exportées reste importante. Pour pallier ce problème, cette même équipe a apporté des modifications supplémentaires à cette souche, afin de lui faire surproduire divers chaperons (WU et al., J. Bacteriol. 180:2830-35, 1998). En outre, bien que  
 35 l'inactivation du gène d'une de ces protéases de ménage exportées n'ait pas de conséquences notables sur la



bactérie, le cumul des mutations peut affecter la viabilité des souches ; MEERMAN et GEORGIOU, (1994, publication précitée) observent ainsi une diminution du taux de croissance pouvant aller jusqu'à 50%.

5 Chez les bactéries lactiques, seules quelques protéases exportées ont fait l'objet d'études ; la mieux caractérisée à l'heure actuelle est la protéase dénommée PrtP (KOK, FEMS Microbiol. Reviews 87:15-42, 1990), qui est localisée à la surface cellulaire, où elle est ancrée  
 10 au peptidoglycane. Cette protéase est présente chez de nombreuses bactéries lactiques, notamment *Lactococcus lactis*, où son gène est plasmidique. Elle participe à la nutrition azotée des bactéries en dégradant les caséines du lait. D'autres protéases de surface ont été purifiées  
 15 à partir de deux espèces de bactéries lactiques, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Lactobacillus helveticus*, mais leur fonction n'a pas été déterminée. (STEFANITSI et al., FEMS Microbiol. Lett. 128:53-8, 1995 ; STEFANITSI et GAREL, Lett. Appl. Microbiol. 24:180-84, 1997 ; YAMAMOTO, et al., J. Biochem. 114:740-45, 1993). Récemment, un gène inducible par le stress codant pour une protéine fortement homologue aux protéases de la famille HtrA a été mis en évidence chez *Lactobacillus helveticus* (SMEDS et al., J. Bacteriol. 180:6148-53, 1998). Il a été observé que ce  
 25 gène était nécessaire à la survie à température élevée ; une souche mutante de *Lactobacillus helveticus* dans laquelle le gène *htrA* a été inactivé par l'insertion d'un gène rapporteur (*gusA*, codant pour la  $\beta$ -glucuronidase)  
 30 sous contrôle du promoteur *htrA*, a été construite. L'étude de l'expression du gène *gusA* dans ce mutant a permis de mettre en évidence une induction de la transcription de ce gène dans les mêmes conditions que celle du gène *htrA* dans les souches sauvages ; en  
 35 revanche, aucune activité  $\beta$ -glucuronidase n'a été observée.

Lors de travaux précédents visant à caractériser des protéines exportées de *Lactococcus lactis* par l'étude de protéines de fusion avec le rapporteur d'exportation  $\Delta_{spNuc}$  (POQUET et al., J. Bacteriol. 180:1904-12, 1998), l'équipe des Inventeurs a observé une importante protéolyse extra-cellulaire, bien que les expérimentations aient été effectuées dans une souche de *L. lactis* subsp. *cremoris* dépourvue de tout plasmide, et donc en particulier de celui qui porte *prtP*.

Les Inventeurs ont entrepris de rechercher des protéases extra-cellulaires responsables de cette protéolyse.

Ils ont ainsi découvert, chez *L. lactis*, l'existence d'un gène de la famille *htrA*.

Ce gène, mis en évidence dans le génome de la souche IL1403 de *L. lactis* subsp. *lactis*, code pour une protéine de 408 acides aminés, dénommée ci-après *HtrA<sub>L1</sub>* dont la séquence nucléotidique et la séquence en acides aminés sont représentées sur la Figure 1, et figurent dans la liste de séquences en annexe (SEQ ID NO: 1). Cette protéine est très homologue à *HtrA* d'*E. coli*, et à divers autres membres connus de la famille *HtrA*, comme le montre le Tableau I ci dessous, qui illustre les pourcentages d'identité et de similarité entre *HtrA<sub>L1</sub>* et différentes protéines de la famille *HtrA* :

TABLEAU I

Protéine	Organisme	% identité	% similarité
HtrA/DegP/ protéase Do	<i>E. coli</i>	31.5	38.2
HhoA/DegQ	<i>E. coli</i>	34.0	40.8
HhoB/DegS	<i>E. coli</i>	29.9	37.3
HtrA	<i>S. typhimurium</i>	32.4	39.1
HtoA	<i>H. influenzae</i>	31.9	39.2
HhoB/DegS	<i>H. influenzae</i>	31.2	40.0
spHtrA	<i>S. pneumoniae</i>	55.6	62.0
HtrA	<i>Lb. helveticus</i>	46.9	54.1
YyxA	<i>B. subtilis</i>	43.5	52.0
YkdA	<i>B. subtilis</i>	42.5	49.4

La protéine *HtrA* de la souche IL1403 de *L. lactis* subsp. *lactis* possède les trois acides aminés Ser,

His et Asp, qui définissent le site catalytique caractéristique des protéases à sérine apparentées à la trypsine, parmi lesquelles la famille HtrA ; en outre elle présente, autour de ces trois acides aminés, les  
 5 trois motifs suivants : DAYVVTNYH<sub>127</sub>VI, D<sub>157</sub>LAVLKIS, et GNS<sub>239</sub>GGALINIEGQVIGIT, qui correspondent aux consensus définis par PALLAN et WREN (Mol. Microbiol. 19:209-21, 1997) pour le domaine catalytique des protéases HtrA : -GY--TN-HV-, D-AV---- et GNSGG-L-N-G--IGIN.

10 Elle possède à son extrémité N-terminale une séquence d'acides aminés hydrophobes L<sub>10</sub>LTGVVGGAI<sub>26</sub> correspondant à un segment transmembranaire putatif. La protéine HtrA<sub>L1</sub> de *L. lactis* subsp. *lactis* serait donc une protéine intégrale de la membrane cytoplasmique. Selon la  
 15 règle dite « du positif interne » concernant la topologie de ces protéines (VON HEIJNE, Nature, 341:456-8, 1989) sa topologie correspond au type « C-out », c'est-à-dire que sa partie C-terminale, qui comprend en particulier son site catalytique, serait exposée à l'extérieur de la  
 20 membrane plasmique. Comme la protéase HtrA de *E. coli*, HtrA<sub>L1</sub> de *L. lactis* subsp. *lactis* apparaît donc comme une protéase de l'enveloppe, pouvant dégrader des protéines exportées. Les acides aminés du domaine catalytique et du domaine transmembranaire sont encadrés sur la figure 1.

25 Les Inventeurs ont procédé à l'inactivation de ce gène par mutation ; à température optimale (30°C), la souche mutante de *L. lactis* subsp. *lactis* ainsi obtenue est viable et croît normalement ; en revanche à 37°C, on n'observe aucune croissance sur boîte, et une croissance  
 30 très faible en milieu liquide. En outre, les Inventeurs ont étudié l'effet de cette mutation sur l'exportation de différentes protéines de fusion, et ont constaté que l'inactivation de la protéase HtrA<sub>L1</sub> chez *L. lactis* suffisait à abolir totalement la dégradation des  
 35 protéines exportées ; cet effet est surprenant, compte tenu de la protéolyse résiduelle observée antérieurement

chez d'autres bactéries après inactivation de protéases de la famille HtrA.

La présente invention a pour objet un procédé pour la production d'une protéine d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'une souche bactérienne susceptible d'être obtenue à partir d'une bactérie à gram positif dont la taille du génome est au plus égale à 3,2 Mb, de préférence au plus égale à 3 Mb, et avantageusement au plus égale à 2,5 Mb, par mutation inactivant la protéase de surface HtrA de ladite bactérie, et exprimant ladite protéine d'intérêt, et l'obtention de ladite protéine d'intérêt exportée par la bactérie.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, la bactérie à gram-positif de départ est choisie parmi des bactéries du groupe constitué par les *Streptococcaceae*, et les *Lactobacillaceae*.

Elle peut également être choisie parmi des bactéries appartenant au groupe constitué par les *Bacillaceae*, notamment des genres *Staphylococcus* et *Listeria*, et les *Enterococcaceae*, notamment du genre *Enterococcus*.

Avantageusement, ladite souche bactérienne peut également comporter une ou plusieurs autres modifications de son génome, visant à améliorer la production et/ou la sécrétion de protéines exprimées dans ladite bactérie, et/ou à éviter leur dégradation. Selon le type de protéine que l'on souhaite obtenir, on peut par exemple utiliser une souche bactérienne dans laquelle l'activité protéasique PrtP a été inactivée, et/ou une souche bactérienne surproduisant une protéine permettant de stabiliser les protéines exportées, telle que la protéine Nlp4 de *Lactococcus lactis*, ou un de ses homologues (POQUET et al. 1998, publication précitée).

La présente invention a également pour objet toute souche bactérienne, susceptible d'être obtenue à

partir d'une bactérie à gram positif dont la taille du génome est au plus égale à 3,2 Mb, telle que définie ci-dessus, par mutation inactivant la protéase de surface HtrA de ladite bactérie, et comprenant en outre au moins  
 5 une cassette d'expression d'un gène d'intérêt, à l'exception d'une souche de *Lactobacillus helveticus* comprenant une seule cassette d'expression, constituée par la séquence codant pour le gène rapporteur *gusA* insérée dans le gène *htrA* de ladite souche, sous contrôle  
 10 transcriptionnel du promoteur dudit gène.

On entend par : « cassette d'expression » toute construction d'ADN recombinant comprenant un gène d'intérêt que l'on souhaite exprimer, ou un site permettant l'insertion dudit gène, placé sous contrôle de  
 15 séquences de régulation de la transcription (promoteur, terminateur) fonctionnelles dans la bactérie-hôte concernée.

Au sens de la présente invention, on entend par : « protéase HtrA » toute protéase à sérine de type  
 20 trypsine, présentant des similitudes fonctionnelles et structurelles suffisantes avec la protéase HtrA de *E. coli*, pour pouvoir être regroupée dans la même famille, à savoir :

- un site catalytique formé par les trois  
 25 acides aminés Ser, His et Asp ;

- la présence, autour de ce site catalytique, des régions consensus : -GY--TN-HV-, D-AV---- et GNSGG-L-N-G-IGIN ;

- un signal d'exportation permettant à la  
 30 protéase d'être transportée jusqu'à la surface cellulaire de la bactérie (il peut s'agir, par exemple, d'un peptide signal, d'un domaine transmembranaire, d'un signal d'ancrage à la paroi, etc.).

Pour la mise en œuvre de la présente  
 35 invention, on peut obtenir des bactéries mutantes dépourvues d'activité HtrA en effectuant une ou plusieurs

mutations, notamment au niveau de la séquence codant pour la protéase HtrA et/ou au niveau des séquences de régulation permettant l'expression du gène *htrA*, de manière à empêcher l'expression d'une protéase HtrA fonctionnelle. Ces mutations peuvent être effectuées de manière classique, par délétion, insertion, ou remplacement d'au moins un nucléotide ou une séquence nucléotidique dans le gène HtrA ; elles peuvent résulter soit en l'absence de production de HtrA, soit en la production d'une protéase HtrA dans laquelle au moins un acide aminé nécessaire à l'activité a été délété ou remplacé.

Les techniques de mutagenèse appropriées sont connues en elles-mêmes ; avantageusement, on utilisera des techniques de mutagenèse dirigée, dans la mesure où les données disponibles sur les protéases de la famille HtrA permettent, même si l'on ne dispose pas d'informations plus précises sur la séquence spécifique du gène que l'on souhaite inactiver, de cibler la ou les mutations sur des domaines conservés nécessaires à l'activité (par exemple le domaine catalytique).

La présente invention peut être mise en œuvre dans de nombreux domaines.

En premier lieu, elle peut être utilisée dans le domaine de la production de protéines d'intérêt (par exemple enzymes, protéines humaines, etc.) par génie génétique à partir de cultures de bactéries transformées par un gène d'intérêt. Dans ce domaine, la présente invention permet d'améliorer le rendement en protéines exportées (et en particulier sécrétées), et d'éviter leur contamination par des produits de protéolyse, inactifs : ceci permet de les purifier facilement et à moindre coût.

Pour cette application on utilisera de préférence des souches mutantes obtenues à partir de bactéries non-pathogènes, telles que *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., ainsi que des staphylocoques ou des

streptocoques alimentaires, tels que *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus hyicus* ou *Streptococcus thermophilus*.

Les souches mutantes obtenues à partir de  
5 bactéries habituellement utilisées en industrie agro-  
alimentaire, telles que les bactéries lactiques  
(notamment, les lactocoques, les lactobacilles et les  
streptocoques thermophiles), peuvent avantageusement être  
utilisées dans ce même domaine. Par exemple, on peut les  
10 utiliser dans la composition de ferments, pour produire  
des protéines hétérologues permettant d'améliorer la  
qualité du produit fermenté fini ; ainsi, l'exportation  
d'enzymes étrangères produites par une souche mutante de  
*L. lactis* conforme à l'invention, au sein de fromages  
15 fermentés par *L. lactis* peut améliorer leur affinage et  
leurs qualités organoleptiques.

Ces souches mutantes peuvent également être  
utilisées pour l'obtention de produits diététiques ou de  
médicaments. Dans ce domaine on peut par exemple utiliser  
20 des souches mutantes conformes à l'invention afin  
d'exprimer, préalablement à l'ingestion du produit, et/ou  
après son ingestion, des protéines à effet prophylactique  
ou thérapeutique, telles que des enzymes (permettant par  
exemple de faciliter la digestion), des protéines  
25 permettant de stimuler le système immunitaire, des  
antigènes vaccinaux, etc. Dans la plupart des cas, on  
préférera, pour les utilisations dans ce domaine, et afin  
de garantir une innocuité maximale, des souches mutantes  
obtenues à partir de bactéries non pathogènes, et  
30 avantageusement, de bactéries habituellement utilisées  
pour l'alimentation. Cependant, dans le cadre  
d'utilisations vaccinales, on peut utiliser des souches  
mutantes obtenues à partir de bactéries (notamment  
streptocoques, staphylocoques, entérocoques ou listeria)  
35 pathogènes, et de préférence, de variants de ces  
bactéries portant déjà une ou plusieurs mutations

atténuant leur pouvoir pathogène ; l'inactivation de la protéine HtrA, en limitant les capacités de survie de ces bactéries en conditions de stress, peut contribuer à atténuer leur virulence, comme observé précédemment dans le cas de certaines bactéries à gram-négatif.

Dans le cadre de certaines applications, dans lesquelles la bactérie hôte doit être viable et capable de produire des protéines à des températures de l'ordre de 35 à 40°C, par exemple la production en fermenteur de certaines protéines, ou la production après ingestion, dans le tractus digestif de l'homme ou d'un animal, de protéines à activité thérapeutique ou prophylactique, on utilisera avantageusement des souches mutantes obtenues à partir de bactéries thermophiles, telles que *Streptococcus thermophilus*.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs, illustrant l'obtention de mutants de *L. lactis* dans lesquels la protéase de surface HtrA est inactive, et les propriétés de ces mutants.

#### **EXEMPLE 1 : INACTIVATION DU GÈNE *htrA* DE *L. lactis***

Le gène *htrA*, porté par le chromosome de la souche IL1403 (CHOPIN et al. Plasmid, 11, 260-263, 1984) de *L. lactis* subsp. *lactis*, a été inactivé par intégration d'un plasmide suicide portant un fragment interne du gène (FA) de 665 pb.

A titre de témoin positif d'intégration, on a utilisé un plasmide suicide portant un fragment tronqué en 3' (GA) de 902pb, dont l'intégration sur le chromosome restitue une copie sauvage du gène.

Ces fragments ont été préalablement obtenus par amplification PCR, à partir de l'ADN génomique de la souche IL1403 de *L. lactis* subsp. *lactis*, en utilisant les couples d'amorces F/A et G/A :

- F [5'-GGAGCCA(G/T)(A/C/T)GC(A/G/C/T)(C/T)T(A/G/T)GG-3'] localisée en aval du codon d'initiation ATG



- G [5'-GTTTCCACTTTTCTGTGG-3']

localisée en amont du promoteur de *htrA*

- A [5'-TT(A/T)CC(A/T)GG(A/G)TT(A/G/T)AT(A/G/C/T)GC-3'].

localisée en amont du codon de la sérine du site  
5 catalytique.

L'emplacement des amorces, F, G, et A, est indiqué sur la figure 1.

L'amplification a été effectuée dans les conditions suivantes :

10 - mélange réactionnel : 0,2mM de chaque dNTP, 5µM de chaque oligonucléotide, environ 500ng d'ADN chromosomique, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 unité de Taq-DNA-pol (BOEHRINGER MANNHEIM) dans le tampon Taq fourni par le fabricant ;

15 - conditions de température : 5min 94°C, 30 cycles (30sec à 94°C, 30sec à 46°C et 30sec à 72°C), et 4°C.

Les fragments amplifiés ont été ligaturés au plasmide linéaire pGEM<sup>T</sup> (PROMEGA). Après transformation de  
20 *E. coli* TG1 par les produits de ligation, les clones résistants à l'ampicilline, et dépourvus d'activité β-galactosidase sont sélectionnés. Les plasmides obtenus, portant respectivement les fragments FA et GA, sont dénommés pES1.1 et pES2.1.

25 Les inserts FA et GA ont été sous-clonés dans un vecteur suicide portant un gène de résistance au chloramphénicol. Ce vecteur étant incapable de se répliquer seul en l'absence de la protéine RepA qui est nécessaire à l'initiation de sa réplication, des co-  
30 intégrats ont été créés par ligation entre chacun des plasmides pES1.1 et pES2.1, et le vecteur suicide, préalablement linéarisés.

Après transformation de la souche TG1 d'*E. coli*, et sélection des clones résistant au  
35 chloramphénicol, la partie pGEM<sup>T</sup> des cointégrats a été déléetée, et les vecteurs re-circularisés. Les plasmides

obtenus sont multipliés dans la souche d'*E. coli* TG1 repA<sup>+</sup> ; après sélection des clones résistant au chloramphénicol, on obtient les plasmides suicide dénommés pVS6.1 et pVS7.4.

5 pVS6.1 contient le fragment FA, et pVS7.4 contient le fragment GA du gène *htrA<sub>LI</sub>* de la souche IL1403 de *L. lactis* subsp. *lactis*.

Ces plasmides ont été utilisés pour transformer la souche IL1403 de *L. lactis* subsp. *lactis* ;  
10 les clones ayant intégré ces plasmides au locus *htrA* sur le chromosome ont été sélectionnés en présence de chloramphénicol.

Dans les deux cas, plusieurs clones indépendants résistants au chloramphénicol ont été  
15 obtenus. Cinq clones de chaque classe, notés A à E dans le cas de l'intégration de pVS6.1, et 17 à 22 dans le cas de l'intégration de pVS7.4, ont été choisis pour analyse.

Pour chacun de ces clones, l'intégration au locus *htrA* a été confirmée par transfert de Southern.

20 Deux clones, A et 17, ont été choisis pour les analyses suivantes ; ils constituent les deux prototypes des souches mutantes, qui seront dénommées ci-après :

- *htrA* (mutation nulle du gène *htrA<sub>LI</sub>*, Cm<sup>R</sup>) ; cette souche n'exprime pas de protéase HtrA active ;
- 25 - *htrA<sup>+</sup>/htrA* (copie sauvage + copie tronquée du gène *htrA<sub>LI</sub>*, Cm<sup>R</sup>) ; cette souche exprime une protéase HtrA<sub>LI</sub> active.

#### EXEMPLE 2 : RÔLE DU GÈNE *htrA<sub>LI</sub>* DE *L. lactis* DANS LA SURVIE À HAUTE TEMPÉRATURE

30 Les deux souches *htrA* et *htrA<sup>+</sup>/htrA* sont cultivées, en culture liquide, dans les conditions habituelles de croissance de *L. lactis*, c'est-à-dire à 30°C et en présence d'oxygène mais sans agitation, et en présence de chloramphénicol.

35 Le comportement de la souche *htrA* de *L. lactis* subsp. *lactis* à 30°C et à 37°C, a été étudié en utilisant

comme témoins la souche *htrA*<sup>+</sup>/*htrA*, ainsi que la souche-mère IL403 (cultivée en l'absence de chloramphénicol).

Les bactéries ont été cultivées pendant 1 nuit à température ambiante, en milieu M17 contenant 1% de glucose (+2,5 µg/ml chloramphénicol pour les deux souches *htrA* et *htrA*<sup>+</sup>/*htrA*). Les cultures ont été diluées au 1/100<sup>ième</sup> le matin dans le même milieu, et divisées en deux lots placés en semi-anaérobiose à 30°C ou à 37°C. La croissance a été suivie par mesure de la DO<sub>600</sub>.

Les résultats sont illustrés par la Figure 2.

A 30°C (Fig. 2A), on constate que la souche *htrA*<sup>+</sup>/*htrA* (■), la souche *htrA* (◆), et la souche sauvage IL1403 (▲) présentent des temps de génération très proches : 65 min pour la souche sauvage, 70 min. pour *htrA*<sup>+</sup>/*htrA*, et 75 min pour *htrA* ; enfin, pour les 3 cultures, les valeurs de DO<sub>600</sub> correspondant à la phase stationnaire sont très comparables (log (DO<sub>600</sub>) = 2,1 à 2,2).

Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas de différence de croissance significative entre ces trois souches à 30°C.

A 37°C (Fig. 2B), la souche *htrA*<sup>+</sup>/*htrA* (■) a un temps de génération de 100 min, et la DO<sub>600</sub> de la phase stationnaire est moindre qu'à 30°C (log (DO<sub>600</sub>) = 1,25). Une croissance plus faible à 37°C qu'à 30°C est également observée pour la souche sauvage IL1403 (▲) ; le temps de génération est de 65 min, mais la DO<sub>600</sub> de la phase stationnaire est plus faible qu'à 30°C (log (DO<sub>600</sub>) = 1,9). Dans le cas de la souche *htrA* (◆) la croissance est très faible, voire nulle, et log (DO<sub>600</sub>) ne dépasse pas 0,1 même après 7h de culture.

Il ressort de ces résultats que la souche *htrA* de *L. lactis* subsp. *lactis* est thermosensible, et que la mutation *htrA* est létale à 37°C.

### EXEMPLE 3 : RÔLE DU GÈNE *htrA<sub>LI</sub>* DE *L. LACTIS* DANS LA PROTÉOLYSE DE SURFACE

L'effet de la mutation *htrA<sub>LI</sub>* sur la stabilité de cinq protéines exportées a été testé. Ces protéines sont :

5 i) une protéine hétérologue, la nucléase sécrétée de *S. aureus*, Nuc ; cette protéine est exprimée par le plasmide pNuc3 (LE LOIR et al., J. Bacteriol. 176:5135-5139, 1994 ; LE LOIR et al., J. Bacteriol. 10 180:1895-903 1998) ;

ii) trois protéines hybrides (*Usp-Δ<sub>Sp</sub>Nuc*, *Nlp4-Δ<sub>Sp</sub>Nuc*, et *Exp5-Δ<sub>Sp</sub>Nuc*) résultant de la fusion entre le rapporteur *Δ<sub>Sp</sub>Nuc* et des fragments de protéines exportées de *L. lactis* : la protéine sécrétée *Usp45* (VAN 15 ASSELDONK et al., Gene 95:155-60, 1990), la lipoprotéine *Nlp4*, et la protéine *Exp5* (qui est elle-même une protéine de fusion entre une protéine exportée et une protéine cytoplasmique) ; ces protéines, ainsi que les plasmides *pVE8009*, *pVE8024* et *pVE8021* qui les expriment 20 respectivement, sont décrits par POQUET et al. (1998, publication précitée) ;

iii) une protéine naturellement exportée de *L. lactis*, *AcmA*.

Chez la souche sauvage MG1363 de *L. lactis* 25 subsp. *cremoris*, *Usp-Δ<sub>Sp</sub>Nuc* est sécrétée, *Nlp4-Δ<sub>Sp</sub>Nuc* est associée aux cellules ; pour ces 2 protéines, on détecte dans le milieu, à côté de la forme mature, différents produits de dégradation, parmi lesquels le peptide *NucA* provenant de la partie *Δ<sub>Sp</sub>Nuc* de la fusion ; quant à la 30 fusion tripartite *Exp5-Δ<sub>Sp</sub>Nuc*, elle est très instable et on ne détecte pas la forme mature dans le milieu mais seulement les produits de dégradation, dont le peptide *NucA*. La forme mature, ainsi que les produits de dégradation de ces trois protéines hybrides peuvent être 35 détectées à l'aide d'anticorps anti-*NucA*.

La protéine naturellement exportée de *L. lactis* choisie est la bactériolysine AcmA (BUIST et al., J. Bacteriol. 177:1554-1563, 1995). Cette protéine qui dégrade le peptidoglycane est à la fois sécrétée et associée à la surface, probablement par affinité avec son substrat. Elle présente, aussi bien chez la souche MG1363 de *L. lactis* subsp. *cremoris* que chez la souche IL1403 de *L. lactis* subsp. *lactis*, des produits de protéolyse actifs et donc détectables, comme la protéine intacte, par zymogramme.

Les souches transformées par les plasmides exprimant ces différentes protéines sont cultivées à 30°C pendant plusieurs heures, au moins jusqu'au milieu de la phase exponentielle ou jusqu'au début de la phase stationnaire.

Pour chaque plasmide, des cultures des trois souches IL1403, *htrA*, et *htrA<sup>+</sup>/htrA*, ayant atteint des DO<sub>600</sub> comparables ont été utilisées pour extraire des échantillons protéiques : a) de la culture totale, b) des cellules, c) du milieu, selon le protocole décrit par POQUET et al., (1998, publication précitée).

Ces échantillons sont soumis à une électrophorèse (SDS-PAGE) sur gel dénaturant.

Pour détecter les protéines Nuc, Usp- $\Delta_{Sp}$ Nuc, Nlp4- $\Delta_{Sp}$ Nuc, Exp5- $\Delta_{Sp}$ Nuc, et leurs produits de dégradation, on procède à un transfert des protéines sur membrane, puis à une révélation immunologique grâce à des anticorps anti-NuCA, qui sont détectés à l'aide d'un conjugué protéine G/peroxydase (BIO-RAD), et d'un kit de chimioluminescence (DUPONT-NEN).

AcmA est détecté par zymogramme (BUIST et al., 1995, publication précitée) : des microcoques dont la paroi est sensible à AcmA sont inclus dans le gel d'électrophorèse à la concentration de 0,2%, ce qui le rend opaque ; après électrophorèse, le gel est traité à 37°C pendant une nuit dans un tampon contenant 50mM de

Tris/HCl à pH7 et 0,1% de Triton X100, ce qui permet la lyse des microcoques par AcmA ou ses produits de protéolyse actifs. Le gel est ensuite coloré par du bleu de méthylène à 0,1% dans du KOH à 0,01% : les bandes  
 5 correspondant à l'activité AcmA apparaissent comme des halos d'hydrolyse transparents sur fond bleu.

Pour chaque protéine, les profils de dégradation dans les souches IL1403, *htrA*, et *htrA<sup>+</sup>/htrA*, ont été comparés en observant le contenu protéique  
 10 accumulé pendant plusieurs heures de culture.

Les Figures 3 à 6 présentent respectivement les résultats de détection immunologique, pour les protéines Nuc, Usp- $\Delta_{Sp}$ Nuc, Nlp4- $\Delta_{Sp}$ Nuc et Exp5- $\Delta_{Sp}$ Nuc. Pour les protéines Nuc, (Fig.3) et Usp- $\Delta_{Sp}$ Nuc, (Fig.4),

15 La Fig. 7 représente un zymogramme de l'activité bactériolysine d'AcmA ; la détection a été effectuée sur l'ensemble de la culture (T), les cellules seules (C) ou le milieu (M).

#### Chez la souche IL1403 :

20 Pour les protéines sécrétées Nuc et Usp- $\Delta_{Sp}$ Nuc (Fig. 3 et 4 : trois premiers puits), et pour la lipoprotéine Nlp4- $\Delta_{Sp}$ Nuc (Fig.5 : premier puits), on détecte un profil de trois bandes, comme précédemment observé chez la souche MG1363 (LE LOIR et al., 1994 ;  
 25 POQUET et al., 1998, publications précitées) :

a) celle de plus haut poids moléculaire est le précurseur dont le peptide-signal n'a pas été clivé, ce qui est confirmé par sa présence exclusive dans les cellules (Fig. 3 et 4) ;

30 b) la bande intermédiaire est la forme mature après clivage du peptide-signal, et elle est présente exclusivement dans le milieu dans le cas des protéines sécrétées Nuc et Usp- $\Delta_{Sp}$ Nuc (Fig. 3 et 4) ;

c) la bande de plus faible poids moléculaire  
 35 est le peptide NucA qui comigre pratiquement avec la forme commerciale NucA purifiée à partir de *S. aureus* (la

légère différence de migration étant due aux spécificités de clivage distinctes chez *S. aureus* et *L. lactis*), et qui se trouve à la fois libéré dans le milieu et associé aux cellules.

5                    Pour la protéine Exp5- $\Delta_{SP}$ Nuc (Fig. 6 : premier puits) on ne détecte que très difficilement deux formes, une de haut poids moléculaire, et une de faible poids moléculaire, NucA, qui comigre pratiquement avec la forme purifiée commerciale ; la protéolyse chez IL1403 est donc  
10 pratiquement totale.

Pour la protéine AcmA (Fig. 7 : les trois premiers puits), on détecte comme précédemment observé chez la souche MG1363 (BUIST et al., 1995, publication précitée), un profil de quatre bandes :

15                    a) celle de plus haut poids moléculaire est le précurseur dont le peptide-signal n'a pas été clivé, qui est présent exclusivement dans les cellules;

b) la bande de poids moléculaire légèrement inférieur est la forme mature après clivage du peptide-signal, qui est à la fois sécrétée dans le milieu et associée à la surface des cellules par affinité pour son  
20 substrat;

c et d) les deux bandes de plus faible poids moléculaire sont des produits de protéolyse actifs, à la fois sécrétés dans le milieu et associés à la surface des  
25 cellules par affinité pour leur substrat.

Chez la souche *htrA<sup>+</sup>/htrA* :

(Fig. 3 et 4 : trois derniers puits, Fig.5 et 6 : dernier puits, et Fig. 7 : trois derniers puits). Les  
30 profils observés sont absolument identiques à ceux observés dans la souche sauvage. La souche *htrA<sup>+</sup>/htrA* présente donc un phénotype de protéolyse sauvage, s'expliquant par la copie sauvage du gène *htrA<sub>L1</sub>* qu'elle possède.

Chez la souche *htrA* :

(Fig. 3 et 4 : trois puits centraux, Fig.5 et 6 : puits central, et Fig. 7 : trois puits centraux).

5 Dans tous les cas, on ne détecte aucun des produits de protéolyse ; simultanément, la quantité de protéine mature (ou de haut poids moléculaire dans le cas de Exp5- $\Delta_{SpNuc}$ ) augmente.

10 Ces résultats montrent que le produit du gène *htrA<sub>L1</sub>* est bien responsable de la dégradation des protéines sécrétées, et que son inactivation entraîne l'abolition totale de cette dégradation.





165	170	175	
tta aca att ggt gaa cct gcc att gcc gtt ggc tca cct tta ggt agt Leu Thr Ile Gly Glu Pro Ala Ile Ala Val Gly Ser Pro Leu Gly Ser 180 185 190 195			814
caa ttt gca aac acc gca act gaa gga att tta tct gca aca agc cgt Gln Phe Ala Asn Thr Ala Thr Glu Gly Ile Leu Ser Ala Thr Ser Arg 200 205 210			862
caa gtg act ttg acc caa gaa aat ggt caa aca act aat atc aat gca Gln Val Thr Leu Thr Gln Glu Asn Gly Gln Thr Thr Asn Ile Asn Ala 215 220 225			910
att caa aca gat gct gcc att aac cct ggt aac tct gga ggg gct ttg Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asn Pro Gly Asn Ser Gly Gly Ala Leu 230 235 240			958
att aat att gaa gga caa gtt att gga att act caa agt aaa att aca Ile Asn Ile Glu Gly Gln Val Ile Gly Ile Thr Gln Ser Lys Ile Thr 245 250 255			1006
aca act gaa gat ggt tct act tct gtc gaa ggt tta gga ttt gcg att Thr Thr Glu Asp Gly Ser Thr Ser Val Glu Gly Leu Gly Phe Ala Ile 260 265 270 275			1054
cct tct aat gat gtc gta aat atc att aat aaa ctt gaa gat gat ggt Pro Ser Asn Asp Val Val Asn Ile Ile Asn Lys Leu Glu Asp Asp Gly 280 285 290			1102
aag att tca cgc cct gct tta ggt atc cga atg gtt gac ctt tca caa Lys Ile Ser Arg Pro Ala Leu Gly Ile Arg Met Val Asp Leu Ser Gln 295 300 305			1150
tta tca aca aat gac agt tct caa ttg aaa tta cta agc agt gta aca Leu Ser Thr Asn Asp Ser Ser Gln Leu Lys Leu Leu Ser Ser Val Thr 310 315 320			1198
ggt ggg gtt gtt gtt tac tcc gtc caa tct gga ctt cct gct gcc tca Gly Gly Val Val Val Tyr Ser Val Gln Ser Gly Leu Pro Ala Ala Ser 325 330 335			1246
gct ggt ttg aaa gct gga gat gta att aca aag gtt ggc gat aca gca Ala Gly Leu Lys Ala Gly Asp Val Ile Thr Lys Val Gly Asp Thr Ala 340 345 350 355			1294
gta acc tct tca aca gac ttg caa agt gct ctt tac tca cac aat atc Val Thr Ser Ser Thr Asp Leu Gln Ser Ala Leu Tyr Ser His Asn Ile 360 365 370			1342
aat gat aca gta aaa gtt act tat tat cgt gat ggt aaa tca aat aca Asn Asp Thr Val Lys Val Thr Tyr Tyr Arg Asp Gly Lys Ser Asn Thr 375 380 385			1390
gca gat gtt aaa ctt tct aaa tca acc agt gac tta gaa aca agc agt Ala Asp Val Lys Leu Ser Lys Ser Thr Ser Asp Leu Glu Thr Ser Ser 390 395 400			1438
cca tct tct tct aat taataactta ataatttaaat aaaagtccttc tgtaaataga Pro Ser Ser Ser Asn 405			1493
aggctttttt cataactaaag tctgaaattt ttaaaaataa taaattttcca tttttctttt			1553
attgattttat ggtaaaaataa agttaagcat gaaaatttta ctttacttag aagccgaaca			1613

atTTTTgagt cattcaggaa ttggtcgtgc aatgaaacat caacaacgcg cccttgattt 1673  
aatgggcatt gactggacaa aaaatcctga ggatgattac gatatcctcc atttaaatac 1733  
ttatggc 1740

## REVENDECATIONS

1) Procédé pour la production d'une protéine d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en culture d'une souche bactérienne susceptible d'être obtenue à partir d'une bactérie à gram positif dont la taille du génome est au plus égale à 3,2 Mb, par mutation inactivant la protéase de surface HtrA de ladite bactérie, et exprimant ladite protéine d'intérêt, et
- l'obtention de ladite protéine d'intérêt exportée par la bactérie.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisée en ce que la bactérie à gram positif de départ est choisie parmi les *Streptococcaceae*, les *Lactobacillaceae*, les *Bacillaceae* des genres *Staphylococcus* et *Listeria*, et les *Enterococcaceae* du genre *Enterococcus*.

3) Procédé selon la revendication 2, caractérisée en ce que la bactérie à gram positif de départ est choisie dans le groupe constitué par *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., et *Streptococcus thermophilus*.

4) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la souche bactérienne utilisée est également dépourvue de l'activité protéasique PrtP.

5) Souche bactérienne, susceptible d'être obtenue à partir d'une bactérie à gram positif dont la taille du génome est au plus égale à 3,2 Mb, telle que définie dans une quelconque des revendications 1 à 3, par mutation inactivant la protéase de surface HtrA de ladite bactérie, et comprenant en outre au moins une cassette d'expression d'un gène d'intérêt, à l'exception d'une souche de *Lactobacillus helveticus* comprenant une seule cassette d'expression, constituée par la séquence codant pour le gène rapporteur *gusA* insérée dans le gène *htrA* de

ladite souche, sous contrôle transcriptionnel du promoteur dudit gène.

6) Souche bactérienne selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle est également dépourvue de  
5 l'activité protéasique PrtP.

7) Utilisation d'une souche bactérienne telle que définie dans une quelconque des revendications 1 à 4, pour la préparation d'un produit fermenté.

8) Utilisation d'une souche bactérienne telle  
10 que définie dans une quelconque des revendications 1 à 4, pour la préparation d'un aliment diététique.

9) Utilisation d'une souche bactérienne telle que définie dans une quelconque des revendications 1 à 4, pour la préparation d'un médicament.

15 10) Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit médicament est un vaccin.

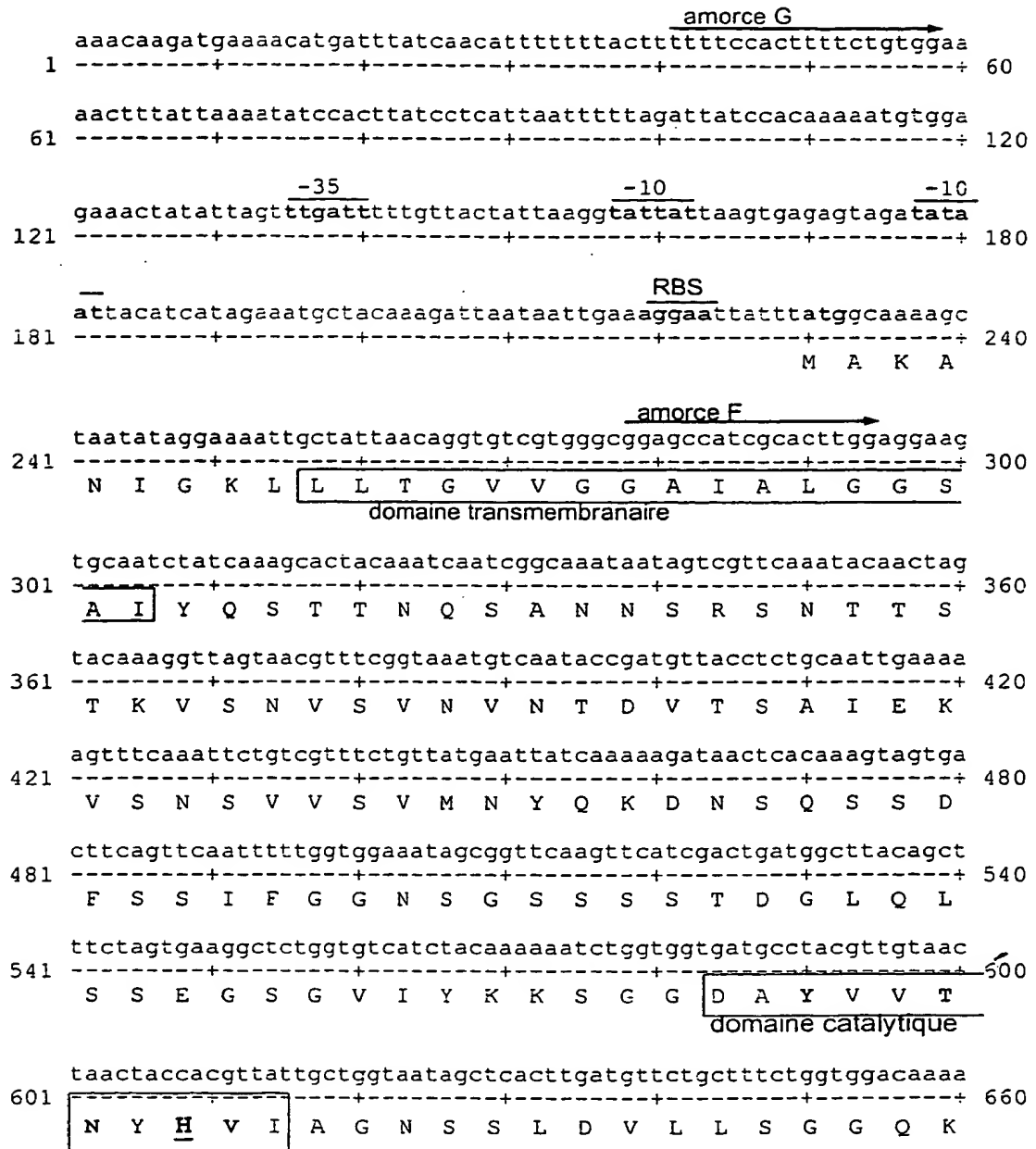


FIG. 1

```

661 agtcaaagattctgtggttggttatgatgaatacacagaccttgctgttctttaaactcag 720
    V K D S V V G Y D E Y T D L A V L K I S
                                domaine catalytique

721 ttctgaacatgtcaaagatgtggcgacattcgctgattctagtaaattaacaattggtga 780
    S E H V K D V A T F A D S S K L T I G E

781 acctgccattgccgttggtcaccttttaggtagtcaatttgcaaacaccgcaactgaagg 840
    P A I A V G S P L G S Q F A N T A T E G

841 aattttatctgcaacaagccgtcaagtgactttgacccaagaaaatgggtcaaacaactaa 900
    I L S A T S R Q V T L T Q E N G Q T T N

                                amorce A
901 tatcaatgcaattcaaacagatgctgccattaaccctggtaactctggaggggctttgat 960
    I N A I Q T D A A I N P G N S G G A L I
                                domaine catalytique

961 taatattgaaggacaagttatttgggaattactcaaagtaaaattacaacaactgaagatgg 1020
    N I E G Q V I G I T Q S K I T T T E D G

1021 ttctacttctgtcgaagggttaggatttgcgattccttctaataatgatgtcgtaaataatcat 1080
    S T S V E G L G F A I P S N D V V N I I

1081 taataaaacttgaagatgatggtaagatttcacgccttgcttttaggtatccgaatggttga 1140
    N K L E D D G K I S R P A L G I R M V D

1141 cctttcacaattatcaacaaatgacagttctcaattgaaattactaagcagtgtaacagg 1200
    L S Q L S T N D S S Q L K L L S S V T G

1201 tgggggttggtgtttactccgtccaatctggacttctgctgcctcagctgggttgaaagc 1260
    G V V V Y S V Q S G L P A A S A G L K A

1261 tggagatgtaattacaaagggttggcgatacagcagtaaacctcttcaacagacttgcaaag 1320
    G D V I T K V G D T A V T S S T D L Q S

```

FIG. 1 (suite)

```

      tgctctttactcacacaatatcaatgatacagtaaaagtacttattatcgtgatggtaa
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
      A L Y S H N I N D T V K V T Y Y R D G K

      atcaaatacagcagatgttaaactttctaaatcaaccagtgacttagaaacaagcagtcc
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
      S N T A D V K L S K S T S D L E T S S P

      atcttcttctaattaataacttaataatttaataaaaagtcttctgtaaatagaaggcttt
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
      S S S N

      tttcatactaaagtctgaaatttttaaaaataataaatttccatttttcttttattgatt
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560

      tatggtaaaaataaagttaagcatgaaaattttactttacttagaagccgaacaatttttg
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620

      agtcattcaggaattggtcgtgcaatgaaacatcaacaacgcgcccttgatttaatgggc
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680

      attgactggacaaaaaatcctgaggatgattacgatatcctccatttaaatacttatggc
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740

```

FIG. 1 (suite)



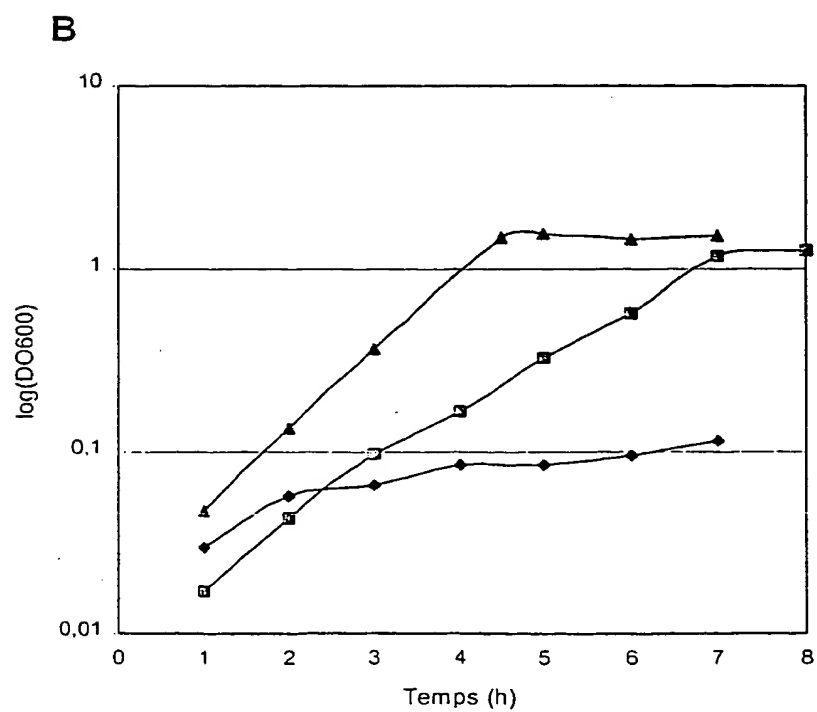
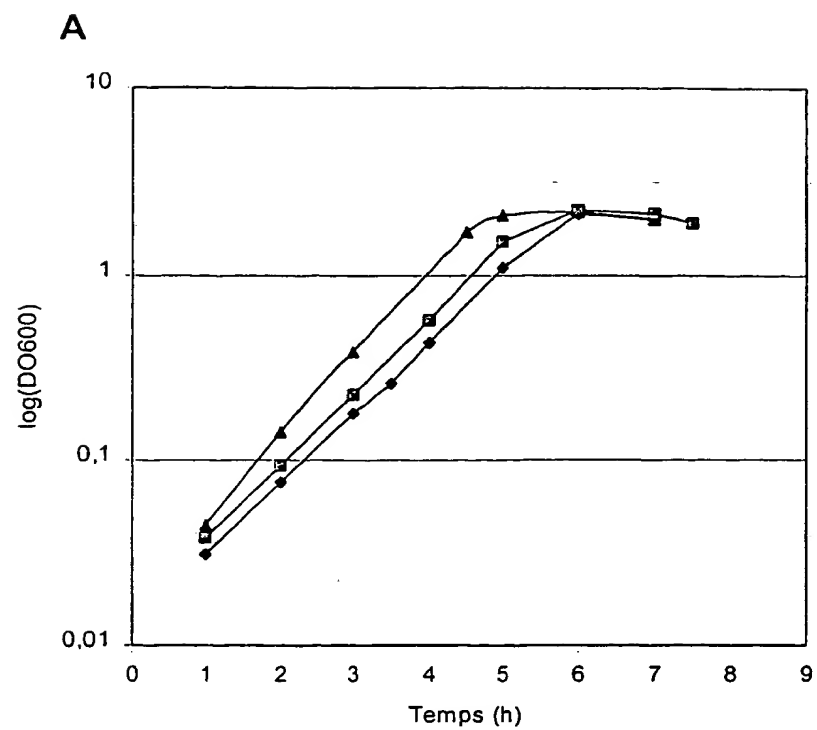


FIG. 2

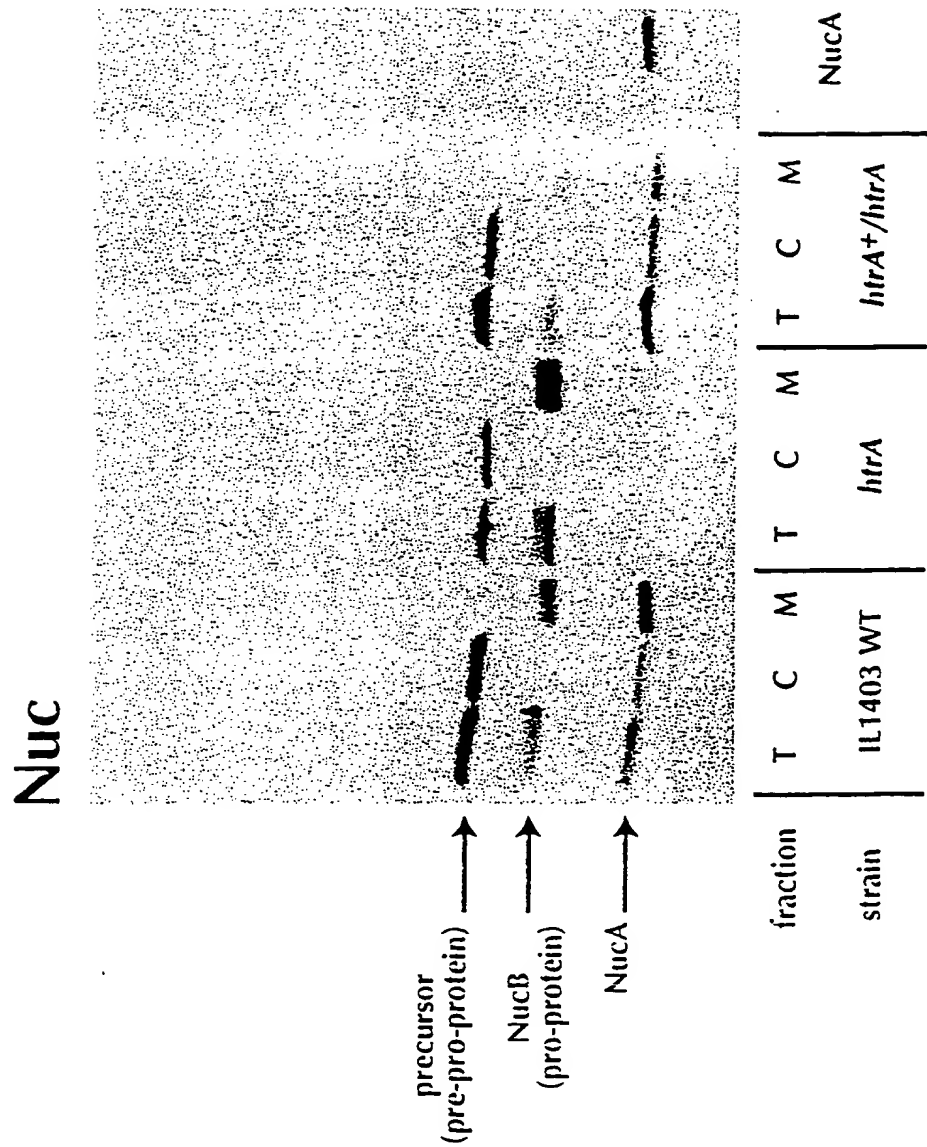


FIG. 3

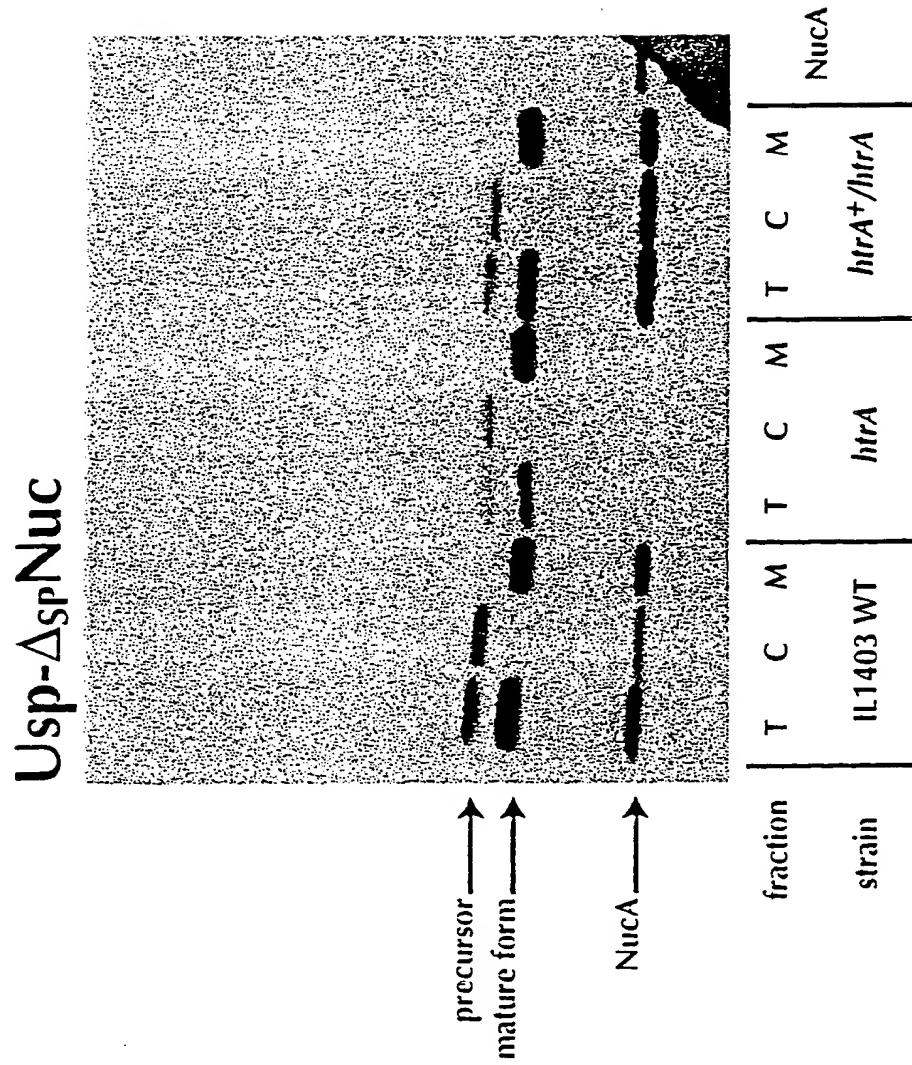


FIG. 4

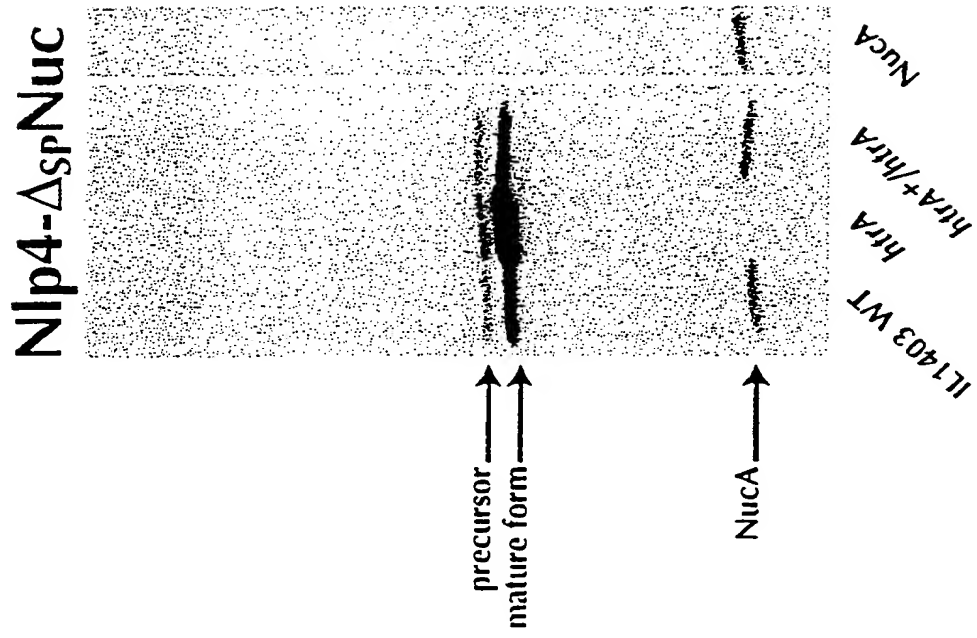


FIG. 5

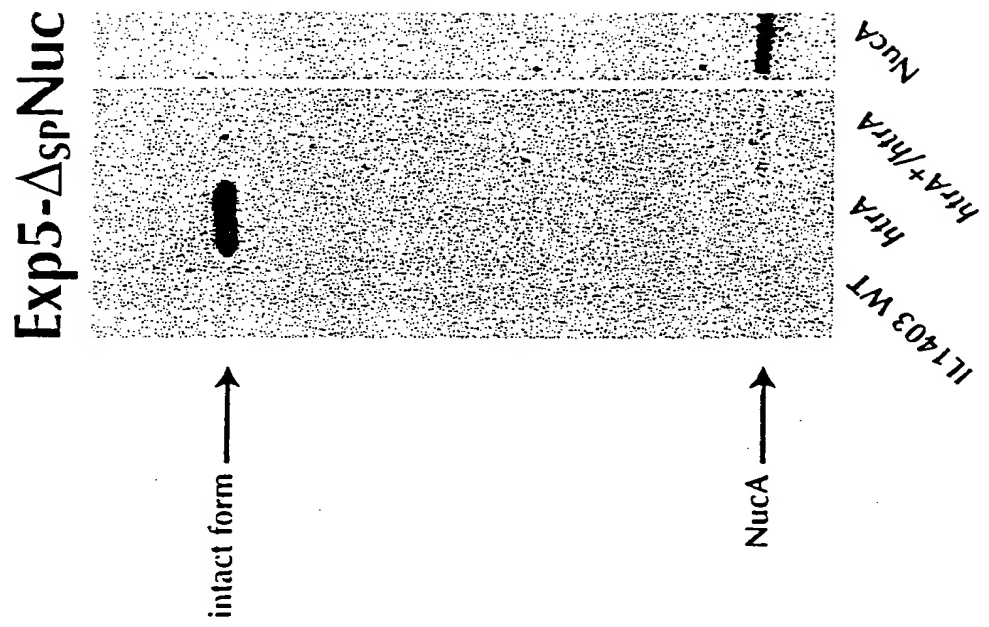


FIG. 6

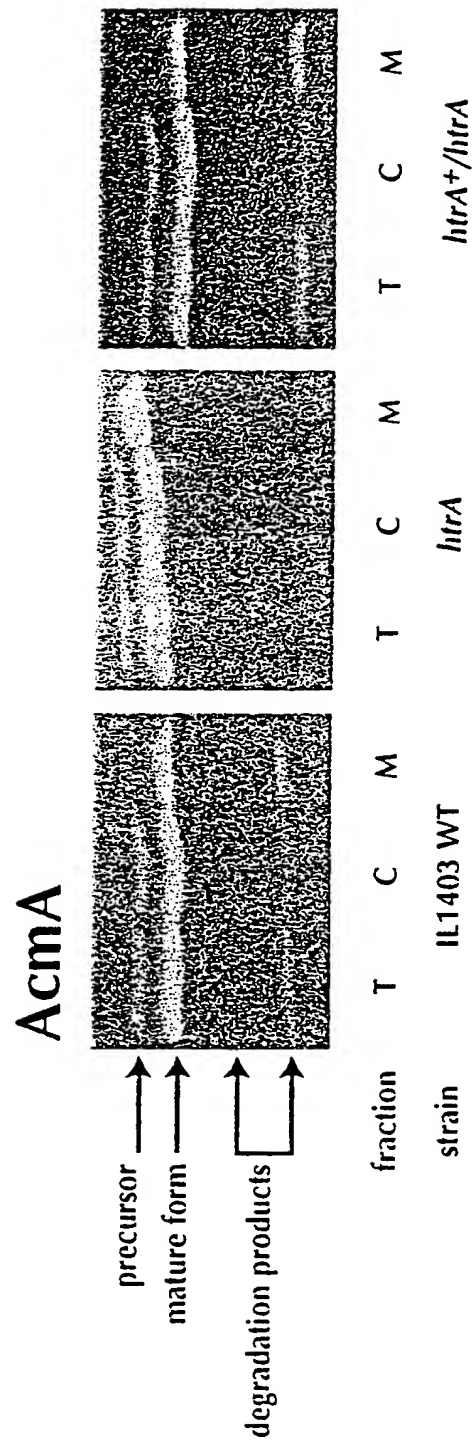


FIG. 7